



Please type a plus sign (+) inside this box → ☐

TRANSMITTAL FORM

(to be used for all correspondence after initial filing)

Total Number of Pages in This Submission 72

| | |
|------------------------|---------------------|
| Application Number | 10/653,350 |
| Filing Date | September 2, 2003 |
| First Named Inventor | Eun Jung Lee et al. |
| Group Art Unit | To Be Assigned |
| Examiner Name | To Be Assigned |
| Attorney Docket Number | A35967 073226.0119 |

ENCLOSURES (check all that apply)

- | | | |
|--|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> Fee Transmittal Form <input type="checkbox"/> Fee Attached <input type="checkbox"/> Amendment / Reply <input type="checkbox"/> After Final <input type="checkbox"/> Affidavits/declaration(s) <input type="checkbox"/> Extension of Time Request <input type="checkbox"/> Express Abandonment Request <input type="checkbox"/> Information Disclosure Statement <input checked="" type="checkbox"/> Certified Copy of Priority Document(s) <input type="checkbox"/> Response to Missing Parts/ Incomplete Application <input type="checkbox"/> Response to Missing Parts under 37 CFR 1.52 or 1.53 | <input type="checkbox"/> Assignment Papers (for an Application) <input type="checkbox"/> Drawing(s) <input type="checkbox"/> Licensing-related Papers <input type="checkbox"/> Petition <input type="checkbox"/> Petition to Convert to a Provisional Application <input type="checkbox"/> Power of Attorney, Revocation Change of Correspondence Address <input type="checkbox"/> Terminal Disclaimer <input type="checkbox"/> Request for Refund <input type="checkbox"/> CD, Number of CD(s) _____ | <input type="checkbox"/> After Allowance Communication to Group <input type="checkbox"/> Appeal Communication to Board of Appeals and Interferences <input type="checkbox"/> Appeal Communication to Group (Appeal Notice, Brief, Reply Brief) <input type="checkbox"/> Proprietary Information <input type="checkbox"/> Status Letter <input checked="" type="checkbox"/> Other Enclosure(s) (please identify below): See attached sheet |
|--|---|---|

Remarks ☐

SIGNATURE OF APPLICANT, ATTORNEY, OR AGENT

| | | |
|-------------------------|--|---|
| Firm or Individual name | BakerBotts LLP 30 Rockefeller Plaza New York, NY 10112 | |
| Signature | <i>Carmella L. Stephens</i> | Att Name: Carmella L. Stephens PTO Reg: 41,328 |
| Date | October 23, 2003 | |

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, PO Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 on this date: October 23, 2003

| | | | |
|-----------------------|-----------------------------|------|------------------|
| Typed or printed name | <i>Carmella L. Stephens</i> | | |
| Signature | <i>Carmella L. Stephens</i> | Date | October 23, 2003 |

대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

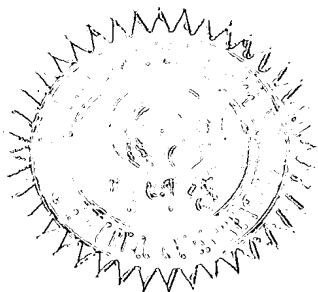
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0052365
Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 08월 31일
Date of Application AUG 31, 2002

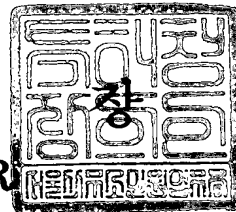
출원인 : 씨제이 주식회사
Applicant(s) CJ Corp.



2003 년 08 월 27 일

특 허 청

COMMISSIONER



출력 일자: 2003/9/3

【서지사항】

【서류명】 출원인정보변경 (경정)신고서
【수신처】 특허청장
【제출일자】 20021025

【출원인】

【명칭】 씨제이 주식회사
【출원인코드】 119980034669

【변경사항】

【변경(경정)항목】 한글 성명(명칭)
【변경(경정)전】 제일제당주식회사
【변경(경정)후】 씨제이 주식회사

【변경사항】

【변경(경정)항목】 영문 성명(명칭)
【변경(경정)전】 CHEIL JEDANG CORPORATION
【변경(경정)후】 CJ Corp.

【변경사항】

【변경(경정)항목】 인감
【변경(경정)전】
【변경(경정)후】

【취지】

특허법시행규칙 제9조·실용신안법시행규칙 제12조·
의장법시행규칙 제28조 및 상표법시행규칙 제23조의
규정에 의하여 위와 같이 신고합니다.

【서지사항】

| | |
|-------------------|---------------------|
| 【서류명】 | 명세서 등 보정서 |
| 【수신처】 | 특허청장 |
| 【제출일자】 | 2002.09.02 |
| 【출원인】 | |
| 【명칭】 | 제일제당 주식회사 |
| 【출원인코드】 | 1-1998-003466-9 |
| 【사건과의 관계】 | 출원인 |
| 【대리인】 | |
| 【성명】 | 손민 |
| 【대리인코드】 | 9-1999-000420-6 |
| 【포괄위임등록번호】 | 2002-028278-6 |
| 【대리인】 | |
| 【성명】 | 이세진 |
| 【대리인코드】 | 9-2000-000320-8 |
| 【포괄위임등록번호】 | 2002-028279-3 |
| 【대리인】 | |
| 【성명】 | 김성남 |
| 【대리인코드】 | 9-1998-000150-9 |
| 【포괄위임등록번호】 | 2002-028280-6 |
| 【사건의 표시】 | |
| 【출원번호】 | 10-2002-0052365 |
| 【출원일자】 | 2002.08.31 |
| 【발명의 명칭】 | 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동중체 |
| 【제출원인】 | |
| 【접수번호】 | 1-1-02-0286019-57 |
| 【접수일자】 | 2002.08.31 |
| 【보정할 서류】 | 명세서등 |
| 【보정할 사항】 | |
| 【보정대상 항목】 | 별지와 같음 |
| 【보정방법】 | 별지와 같음 |
| 【보정내용】 | 별지와 같음 |

【취지】

특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조
의 규정에의하여 위와 같 이 제출합니다. 대리인
손민 (인) 대리인
이세진 (인) 대리인
김성남 (인)

【수수료】

【보정료】 0 원

【추가심사청구료】 0 원

【기타 수수료】 0 원

【합계】 0 원

【첨부서류】

1. 보정내용을 증명하는 서류_1통

【보정대상항목】 요약**【보정방법】 정정****【보정내용】**

본 발명은 본원에 특정된 부위에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체, 이를 암호화한 유전자, 이 유전자를 포함하는 발현 벡터, 이 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 진핵세포, 이 형질전환체 또는 형질감염체를 배양하고 그 배양물로부터 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체를 분리해내는 과정을 포함한 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체의 제조방법, 이러한 방법으로부터 제조된 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체와 이를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

【보정대상항목】 식별번호 10**【보정방법】 정정****【보정내용】**

인터페론-알파는 많은 조직내의 세포에서 생산될 수 있으나 그 생산량은 매우 낮으며, 주로 단구세포(monocyte)/거식세포(macrophage)와 B 임파구와 같은 백혈구에서 많이 생산된다. 이 때에 생성된 인터페론들의 아형(subtype)의 비율은 생산되는 세포의 종류와 생산 조건에 따라 다양하게 나타나고 있다. 이들 인터페론의 생산은 주로 바이러스의 감염에 의해 유도되는 것으로 알려져 있으나, 그 외에도 박테리아, 마이코플라즈마(Mycoplasma), 프로토조아(Protozoa) 등에

의해서도 인터페론의 생산이 유도되며, 특히 그람 음성 박테리아의 당지질 (lipopolysaccharide: LPS)은 강력한 인터페론 유도 물질로 알려져 있다.

【보정대상항목】 식별번호 13

【보정방법】 정정

【보정내용】

인터페론은 만성 활성의 B형 간염, 급성 바이러스성 뇌염 (encephalitides), 비인강의 악성종양(nasopharyngeal carcinoma)등의 치료에 임상적으로 적용하고 있다.

【보정대상항목】 식별번호 15

【보정방법】 정정

【보정내용】

생리활성 단백질의 체내 안정성을 증대시키기 위해 중합체로써 국제 특허출원공개 WO 98/48840호에서 폴리에틸렌글리콜과 접합시킨 인터페론 알파를 제조하거나, 미국특허공보 제6,399,103호에서 인간 성장 호르몬을 마이크로캡슐화하여 의약품으로 개발한 예가 있다. 그러나 이들 방법은 1차로 단백질을 미생물로부터 생산 및 정제한 후, 부가반응을 수행하여야 하는 번거로움을 수반하게 된다. 또한 원치 않는 위치에서 교차연결(cross-linking)이 일어날 수 있으며 최종 생산물의 동질성(homogeneity)에 문제점이 있을 수 있다. 다른 접근 방법으로서 당쇄화를 이용하는 방법이 있다. 세포 표면 단백질 및 진핵 세포에 의해 생산되는 분비 단백질들은 당쇄화에 의해서 변이된다. 당쇄화는 단백질의 물리적 성질

은 물론, 단백질의 생체 내에서의 안정성 및 기능에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

【보정대상항목】 식별번호 26

【보정방법】 정정

【보정내용】

또 다른 관점으로서, 본 발명은 상기 특정 부위에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화하는 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

【보정대상항목】 식별번호 27

【보정방법】 정정

【보정내용】

또 다른 추가의 관점으로서, 본 발명은 상기 특정 부위에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화하는 유전자를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환 또는 형질 감염된 숙주 세포를 제공한다.

【보정대상항목】 식별번호 28

【보정방법】 정정

【보정내용】

또 다른 추가의 관점으로서, 본 발명은 상기 특정 부위에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화하는 유전자를 포함하는 발현 벡터로 형질 전환 또는 형질 감염된 숙주 세포를 적절한 배지 및 조건하에 배양하여 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체를 분리함을 특징으로 하는, 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체 제조 방법을 제공한다.

【보정대상항목】 식별번호 32

【보정방법】 정정

【보정내용】

본원에서 사용된 용어 인간 인터페론 알파의 동종체(isoform)는 천연형 인간 인터페론 알파의 고유 아미노산 서열 잔기 하나 또는 그 이상에서 다른 아미노산 잔기로 변이가 이루어졌으나 그의 고유한 활성을 그대로 유지하는 유사체 또는 변이체를 의미한다.

【보정대상항목】 식별번호 53

【보정방법】 정정

【보정내용】

더욱 바람직한 양태로서, 본 발명은 26번째 류신 또는 134번째 라이신 중에서 하나 또는 둘 모두를 아스파라긴으로 변이시킨 인간 인터페론 알파 동종체를 포함한다.

【보정대상항목】 식별번호 66

【보정방법】 정정

【보정내용】

더욱 바람직한 양태로서, 본 발명은 26번째 류신 또는 134번째 라이신 중에서 하나 또는 둘 모두를 아스파라긴으로 변이시킨 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화하는 유전자를 포함한다.

【보정대상항목】 식별번호 114

【보정방법】 정정

【보정내용】

L26N 변이 인간 인터페론 알파 동종체의 제작방법과 동일한 방법으로 인간 인터페론 알파 유전자를 IFN-A5' 와 K134N2, K134N1과 IFN-A3' 합성 올리고데옥시뉴클레오타이드로 각각 PCR로 증폭시켜 DNA단편을 제작하였다. 결과적으로 도 4에 나타낸 바와 같이 134번째 아미노산 위치에 라이신 대신 아스파라긴에 해당하는 코돈으로 변이된 두 개의 DNA 단편을 얻을 수 있었다. 이렇게 하여 얻은 두 가

지의 DNA 단편을 넣어주고 IFN-A5' , IFN-A3' 를 프라이머 쌍으로 하여 두 번째 PCR을 수행하면 134번째 아미노산이 아스파라긴으로 변이되어 부가적인 당쇄화가 일어날 수 있는 IFN-alpha-K134N의 변이유전자를 얻을 수 있었다.

【보정대상항목】 청구항 3

【보정방법】 정정

【보정내용】

제 2항에 있어서, 26번째 류신 또는 134번째 라이신 중에서 하나 또는 둘 모두를 아스파라긴으로 변이시킨 인간 인터페론 알파 동종체.

【보정대상항목】 청구항 6

【보정방법】 정정

【보정내용】

제 5항에 있어서, 26번째 류신 또는 134번째 라이신 중에서 하나 또는 둘 모두를 아스파라긴으로 변이시킨 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화하는 유전자.

【보정대상항목】 청구항 8

【보정방법】 정정

【보정내용】

제 7항에 있어서, 하기 아미노산 잔기 위치에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화한 유전자를 포함하고 있는 발현 벡터:

-Arg22-Thr52(Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Asn-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52); 및
-Lys134-Ser137(Lys134-Tyr-Ser137).

【보정대상항목】 청구항 9

【보정방법】 정정

【보정내용】

제 8항에 있어서, 26번째 류신 또는 134번째 라이신 중에서 하나 또는 둘 모두를 아스파라긴으로 변이시킨 동종체를 암호화한 유전자를 포함하고 있는 발현 벡터.

【보정대상항목】 청구항 12

【보정방법】 정정

【보정내용】

제 11 항에 있어서, 26번째 류신 또는 134번째 라이신 중에서 하나 또는 둘 모두를 아스파라긴으로 변이시킨 동종체를 암호화한 유전자를 포함하는 벡터로 형질 전환 또는 형질 감염된 진핵 숙주 세포.

【보정대상항목】 청구항 13

【보정방법】 정정

【보정내용】

하기 아미노산 잔기 위치에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파

동종체를 암호화하는 유전자를 포함하는 발현벡터로 형질전환 또는 형질감염된 진핵 숙주 세포를 배양하고 그 배양물로부터 당쇄화된 동종체를 분리하는 과정을 포함하여, 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체를 제조하는 방법:

-Cys1-Ser8(Cys1-Asp-Leu-Pro-Gln-Thr-His-Ser8);

-Arg22-Thr52(Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Asn-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52);

-Ser68;

-Asp77;

-Gln101-Asp114(Gln101-Gly-Val-Gly-Val-Thr-Glu-Thr-Pro-Leu-Met-Lys-Glu-Asp114);

-Lys134-Ser137(Lys134-Tyr-Ser137); 및

-Gln158-Glu165(Gln158-Glu-Ser-Leu-Arg-Ser-Lys-Glu165).

【보정대상항목】 청구항 14

【보정방법】 정정

【보정내용】

제 13항에 있어서, 하기 아미노산 잔기 위치에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화한 유전자를 포함하는 벡터로 형질 전환 또는 형질 감염된 진핵 숙주 세포를 배양하고 그 배양물로부터 당쇄화된 동종체를

분리하는 과정을 포함하여, 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체를 제조하는 방법:

-Arg22-Thr52(Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Asn-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52); 및
-Lys134-Ser137(Lys134-Tyr-Ser137).

【보정대상항목】 청구항 15

【보정방법】 정정

【보정내용】

제 14항에 있어서, 26번째 류신 또는 134번째 라이신 중에서 하나 또는 둘 모두를 아스파라긴으로 변이시킨 동종체를 암호화한 유전자를 포함하는 벡터로 형질 전환 또는 형질 감염된 진핵 숙주 세포를 배양하고 그 배양물로부터 당쇄화된 동종체를 분리하는 과정을 포함하여, 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체를 제조하는 방법.

【보정대상항목】 청구항 18

【보정방법】 정정

【보정내용】

제 17항에 있어서, 26번째 류신 또는 134번째 라이신 중에서 하나 또는 둘 모두를 아스파라긴으로 변이시킨 동종체에 부가적인 당쇄화가 일어난 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체.

【보정대상항목】 청구항 21

【보정방법】 정정

【보정내용】

제 20항에 있어서, 26번째 류신 또는 134번째 라이신 중에서 하나 또는 둘 모두를 아스파라긴으로 변이시킨 동종체에 부가적인 당쇄화가 일어난 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체와 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

【서지사항】

| | |
|-------------------|---|
| 【서류명】 | 특허출원서 |
| 【권리구분】 | 특허 |
| 【수신처】 | 특허청장 |
| 【제출일자】 | 2002.08.31 |
| 【발명의 명칭】 | 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체 |
| 【발명의 영문명칭】 | Glycosylated Human Interferon Alpha Isoform |
| 【출원인】 | |
| 【명칭】 | 제일제당 주식회사 |
| 【출원인코드】 | 1-1998-003466-9 |
| 【대리인】 | |
| 【성명】 | 손민 |
| 【대리인코드】 | 9-1999-000420-6 |
| 【포괄위임등록번호】 | 2002-028278-6 |
| 【대리인】 | |
| 【성명】 | 이세진 |
| 【대리인코드】 | 9-2000-000320-8 |
| 【포괄위임등록번호】 | 2002-028279-3 |
| 【대리인】 | |
| 【성명】 | 김성남 |
| 【대리인코드】 | 9-1998-000150-9 |
| 【포괄위임등록번호】 | 2002-028280-6 |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 이은정 |
| 【성명의 영문표기】 | LEE, Eun Jung |
| 【주민등록번호】 | 771224-2055211 |
| 【우편번호】 | 422-241 |
| 【주소】 | 경기도 부천시 소사구 심곡본1동 |
| 【국적】 | KR |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 박형기 |
| 【성명의 영문표기】 | PARK, Hyung Ki |
| 【주민등록번호】 | 730718-1405216 |

| | |
|------------|---------------------------------|
| 【우편번호】 | 137-071 |
| 【주소】 | 서울특별시 서초구 서초1동 1640-3 수광빌라트 601 |
| 【국적】 | KR |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 김현석 |
| 【성명의 영문표기】 | KIM,Hyun Seok |
| 【주민등록번호】 | 720207-1659719 |
| 【우편번호】 | 138-200 |
| 【주소】 | 서울특별시 송파구 문정동 문정시영아파트 4동 1003 |
| 【국적】 | KR |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 박지숙 |
| 【성명의 영문표기】 | PARK, Ji Sook |
| 【주민등록번호】 | 720504-2030917 |
| 【우편번호】 | 139-220 |
| 【주소】 | 서울특별시 노원구 중계동 시영아파트 101-801 |
| 【국적】 | KR |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 김연향 |
| 【성명의 영문표기】 | KIM,Yeon Hyang |
| 【주민등록번호】 | 661230-2067015 |
| 【우편번호】 | 156-030 |
| 【주소】 | 서울특별시 동작구 상도동 |
| 【국적】 | KR |
| 【발명자】 | |
| 【성명의 국문표기】 | 이현수 |
| 【성명의 영문표기】 | LEE,Hyune Soo |
| 【주민등록번호】 | 621213-1261111 |
| 【우편번호】 | 135-230 |
| 【주소】 | 서울특별시 강남구 일원동 상록수아파트 208-202 |
| 【국적】 | KR |

【발명자】

【성명의 국문표기】 고흥곤
【성명의 영문표기】 KOH,Hyung Kon
【주민등록번호】 580623-1042023
【우편번호】 135-282
【주소】 서울특별시 강남구 대치2동 은마 아파트 3동 114호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 오명석
【성명의 영문표기】 OH,Myung Suk
【주민등록번호】 580826-1029927
【우편번호】 467-810
【주소】 경기도 이천시 마장면 덕평리 374
【국적】 KR

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 10
【서열목록의 전자문서】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인
 손민 (인) 대리인
 이세진 (인) 대리인
 김성남 (인)

【수수료】

| | | |
|-----------------|-------------|-------------|
| 【기본출원료】 | 20 면 | 29,000 원 |
| 【가산출원료】 | 30 면 | 30,000 원 |
| 【우선권주장료】 | 0 건 | 0 원 |
| 【심사청구료】 | 0 항 | 0 원 |
| 【합계】 | 59,000 원 | |

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 본원에 특정된 부위에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체, 이를 암호화한 유전자, 이 유전자를 포함하는 발현 벡터, 이 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 진핵세포, 이 형질전환체 또는 형질감염체를 배양하고 그 배양물로부터 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체를 분리해내는 과정을 포함한 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체의 제조방법, 이러한 방법으로부터 제조된 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체와 이를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

【대표도】

도 2

【색인어】

당쇄화, 인간 인터페론 알파 동종체

【명세서】**【발명의 명칭】**

당쇄화된 인간 인터페론 알파 동중체{Glycosylated Human Interferon Alpha Isoform}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 인간 인터페론 알파 유전자 및 단백질의 서열을 나타낸 것이다. 염기 서열 위의 화살표 또는 직선은 인간 인터페론 알파 단백질의 3차원 구조에서 나선 형태를 나타내는 부위를 표시한 것이며, 화살표의 방향은 아미노산 서열의 순서에 의한 나선의 방향을 표시한다. 성숙 인터페론 알파의 23번째 아미노산인 아르기닌은 기존의 보고된 DNA와 서열은 다르지만 동일한 아미노산을 암호화한다. 변이전 성숙 인터페론 알파 단백질의 106번 스레오닌은 인간 또는 진핵세포에서 생산될 때 당쇄화(O-형)가 일어나는 부위이다.

도 2는 인간 인터페론 알파의 단백질 구조에서의 본 발명에 따른 당쇄화 아미노산 변이 위치를 도시한 것으로 전서열을 포함하고 있다.

도 3은 천연형의 인터페론 알파에서 26번째 아미노산인 류신을 아스파라긴으로 변이시키기 위한 방법을 모식도로 나타낸 것이다.

도 4는 천연형의 인터페론 알파에서 134번째 아미노산인 라이신을 아스파라긴으로 변이시키기 위한 방법을 모식도로 나타낸 것이다.

도 5는 천연형의 인터페론 알파에서 26번째 아미노산인 류신을 아스파라긴으로, 134번째 아미노산인 라이신을 아스파라긴으로 동시에 변이시키기 위한 방법을 모식도로 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<6> 본 발명은 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체에 관한 것이다. 보다 자세하게는, 본 발명은 단백질의 체내 안정성을 증가시키기 위해서 본 원에 따른 특정 부위에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 증가하도록 하나 이상의 아미노산을 다른 아미노산으로 변이시킨 인간 인터페론 알파 동종체 및 및 이의 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체에 관한 것이다.

<7> 인터페론은 1957년 Isaacs와 Lindenmann(Proc. R Soc. Lond[Biol.], 1957, 147, 258-267)에 의해 발견되었으며 강력한 항바이러스 작용이 있는 것으로 알려졌다.

<8> 인터페론을 타입 I 인터페론으로서 인터페론-알파/-베타와 타입 II 인터페론으로서 인터페론 감마로 분류되고 있다. 인터페론-알파는 B 임파구나 대식세포, 인터페론-베타는 섬유아세포(fibroblast), 인터페론-감마는 T 임파구에서 유래한다.

<9> 인간에서 적어도 20여종 이상의 인터페론-알파 유전자와 슈도유전자가 밝혀져 있으며, 이들 인터페론-알파의 단백질들에서 두 개의 이황화결합(Cys1-Cys98;

Cys29-Cys138)이 공통적으로 나타나고 있다. 인간 인터페론-알파에는 N-형 당쇄화 결합 부위가 존재하고 있지 않으나, 천연형의 성숙단백질의 Thr 106 위치에 O-형 당쇄화 결합이 보고되어 있다(Adolf et al., Biochem. J., 276(Pt 2), 511-518, 1991).

<10> 인터페론-알파는 많은 조직내의 세포에서 생산될 수 있으나 그 생산량은 매우 낮으며, 주로 단구세포(monocyte)/거식세포(macrophage)와 B 임파구와 같은 백혈구에서 많이 생산된다. 이 때에 생성된 인터페론들의 아형(subtype)의 비율은 생산되는 세포의 종류와 생산 조건에 따라 다양하게 나타나고 있다. 이들 인터페론의 생산은 주로 바이러스의 감염에 의해 유도되는 것으로 알려져 있으나, 그 외에도 박테리아, 미코플라즈마(Mycoplasma), 프로토조아(Protozoa) 등에 의해서도 인터페론의 생산이 유도되며, 특히 그람 음성 박테리아의 당지질(lipopolysaccharide: LPS)은 강력한 인터페론 유도 물질로 알려져 있다.

<11> 정상인의 조직에서도 인터페론-알파의 mRNA가 지속적으로 생산되고 있음이 보고되어 있으며(Tovey et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1987, vol. 84, 5038-5042), 이 인터페론은 “자가분비(autocrine)” 인터페론으로써 세포의 성장과 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되고 있다.

<12> 인터페론의 생체내 작용기작에 대해서는 아직 잘 알려져 있지는 않으나, Branca와 Baglioni의 보고(Nature, 294, 768-770, 1981)에 의하면 인간의 림포아구(lymphoblastoid) 세포에서 인터페론 - 알파 및 - 베타는 동일한 수용체에 결합하는 사실을 보여주고 있다. 생체 내에서 바이러스의 감염이 일어날 경우, 인터페론이 생성되고, 생성된 인터페론에 의해 유도된 단백질이 인터페론의 작용을

수행하게 된다. 이들 단백질 중 대표적인 것이 2'-5'- 올리고아데닐레이트 합성효소(oligoadenylate synthetase)와 펩티드 사슬 합성을 시작하는데 관여하는 인자인 eIF2(elongation factor2)의 인산화를 시키는 단백질 키나아제(protein kinase)로 알려져 있으며 이 두 효소들은 이중가닥 RNA(Double-Stranded RNA)에 의해 활성화된다(Lengyel P., Annu. Rev. Biochem., 51, 251-282, 1982; Pestka et. al., Annu. Rev. Biochem., 56, 727-777, 1982; De Maeyer and De Maeyer-Guignard J., Interferons and other regulatory cytokines, Wiley, New York).

- <13> 인터페론은 만성 활성의 B형 간염, 급성 바이러스성 뇌염(encaphalitides), 비강인두의 악성종양(nasopharyngeal carcinoma)등의 치료에 임상적으로 적용하고 있다.
- <14> 의약품으로 사용되고 있는 많은 생리활성 단백질들은 대부분 체내 안정성이 낮기 때문에 이들 물질을 사용하는 환자들은 생리활성 단백질이 체내에서 작용을 할 수 있는 일정 수준의 농도를 유지하기 위해 과량 및 잦은 투여를 받게 된다. 이로 인해 환자의 고통과 불편함을 초래하고 있어 이를 경감시키기 위해서 체내 안정성을 증대시킨 생리활성 단백질을 제작하고자 한다.
- <15> 생리활성 단백질의 체내 안정성을 증대시키기 위해 중합체로써 국제 특허공개 WO 98/48840호에서 폴리에틸렌글리콜과 접합시킨 인터페론 알파를 제조하거나, 미국특허공보 제6,399,103호에서 인간 성장 호르몬을 마이크로캡슐화하여 의약품으로 개발한 예가 있다. 그러나 이들 방법은 1차로 단백질을 미생물로부터 생산 및 정제한 후, 부가반응을 수행하여야 하는 번거로움을 수반하게

된다. 또한 원치 않는 위치에서 교차연결(cross-linking)이 일어날 수 있으며 최종 생산물의 동질성(homogeneity)에 문제점이 있을 수 있다. 다른 접근 방법으로서 당쇄화를 이용하는 방법이 있다. 세포 표면 단백질 및 진핵 세포에 의해 생산되는 분비 단백질들은 당쇄화에 의해서 변이된다. 당쇄화는 단백질의 물리적 성질은 물론, 단백질의 생체 내에서의 안정성 및 기능에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<16> 따라서, 본 발명은 유전자 재조합 기술을 사용하여 세포주로부터 생산될 때 인간 인터페론 알파에 당쇄화가 일어나도록하여 목적 단백질의 생산을 용이하게 하며, 체내 안정성도 증가시킬 수 있는 단백질을 제조하는데 있다.

<17> 한가지 관점으로서, 본 발명은 하기 아미노산 잔기 위치에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체를 제공한다.

<18> -Cys1-Ser8(Cys1-Asp-Leu-Pro-Gln-Thr-His-Ser8);

<19> -Arg22-Thr52(Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Asn-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52);

<20> -Ser68;

<21> -Asp77;

<22> -Gln101-Asp114(Gln101-Gly-Val-Gly-Val-Thr-Glu-Thr-Pro-Leu-Met-Lys-Glu-Asp114);

<23> -Lys134-Ser137(Lys134-Tyr-Ser137); 및

<24> -Gln158-Glu165(Gln158-Glu-Ser-Leu-Arg-Ser-Lys-Glu165).

<25> 다른 관점으로서, 본 발명은 상기 특정 부위에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화하는 유전자를 제공한다.

<26> 또 다른 관점으로서, 본 발명은 상기 특정 부위에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화하는 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

<27> 또 다른 추가의 관점으로서, 본 발명은 상기 특정 부위에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화하는 유전자를 포함하는 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주 세포를 제공한다.

<28> 또 다른 추가의 관점으로서, 본 발명은 상기 특정 부위에서 하기 아미노산 잔기 위치에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화하는 유전자를 포함하는 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 진핵 숙주 세포를 배

양하고 그 배양물로부터 당쇄화된 동종체를 분리하는 과정을 포함하여, 당쇄화된 인간 성장 호르몬 동종체를 제조하는 방법을 제공한다.

<29> 또 다른 추가의 관점으로서, 본 발명은 상기 특정 부위에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체에 부가적인 당쇄화가 일어난 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체를 제공한다.

<30> 또 다른 추가의 관점으로서, 본 발명은 상기 특정 부위에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체에 부가적인 당쇄화가 일어난 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체와 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

<31> 또 다른 관점으로서, 본 발명은 인간 인터페론 알파 단백질에 당쇄화 자리의 생성을 위해서 프라이머로 사용된 합성 올리고데옥시뉴클레오타이드를 제공한다.

【발명의 구성 및 작용】

<32> 본원에서 사용된 용어 인간 성장 호르몬의 동종체(isoform)는 천연형 인간 인터페론 알파의 고유 아미노산 서열 잔기 하나 또는 그 이상에서 다른 아미노산 잔기로 변이가 이루어졌으나 그의 고유한 활성을 그대로 유지하는 유사체 또는 변이체를 의미한다.

<33> 본원 명세서에 사용된 아미노산의 삼문자(일문자)는 생화학 분야에서의 표준 약어 규정에 따라 다음의 아미노산을 의미한다:

<34> Ala(A): 알라닌; Asx(B): 아스파라긴 또는 아스파르트산; Cys(C): 시스테인;

<35> Asp(D): 아스파르트산; Glu(E): 글루탐산; Phe(F): 페닐알라닌;

<36> Gly(G): 글라이신; His(H): 히스티딘; Ile(I): 이소류신; Lys(L): 라이신; Leu(L): 류신; Met(M): 메티오닌; Asn(N): 아스파라긴; Pro(P): 프롤린; Gln(Q): 글루타민; Arg(R): 아르기닌; Ser(S): 세린; Thr(T): 쓰레오닌; Val(V): 발린; Trp(W): 트립토판; Tyr(Y): 티로신; Glx(Z): 글루타민 또는 글루탐산.

<37> 본원 명세서에 표기되는 '(아미노산일문자)(아미노산위치)(아미노산일문자)'는 인간 인터페론 알파의 해당 아미노산 위치에서 선행 표기된 아미노산이 후행 표기된 아미노산으로 치환된다는 것을 의미한다. 예를 들면, L26N은 천연형 인간 인터페론 알파의 26번에 해당하는 류신이 아스파라긴으로 치환된다는 것을 가리킨다.

<38> 본원 명세서에 당쇄화 자리의 생성을 위해서 프라이머는 '(아미노산일문자)(아미노산위치)(아미노산일문자)1 또는 2'로 표기되어 있는데 여기서 1은 이중 가닥 주형 중에서 5'→3'방향으로 진행되는 단일 가닥 주형에 상보적인 프라이머이고 2는 이중 가닥 중에서 3'→5'방향으로 진행되는 단일 가닥 주형에 상보적인 프라이머를 말한다.

<39> 숙주 세포로서 진핵 세포에 의해 생성되는 분비 단백질은 하나 이상의 올리고당에 의해서 수식되는데 당쇄화라고 불리는 이러한 수식은 단백질의 물리적인 성질에 급격하게 영향을 끼칠 수 있고 단백질의 안정성, 분비, 그리고 세포내 위치 결정에서도 중요할 수 있는 것으로 알려져 있다. 적절한 당쇄화는 생물학적 활성에 필수적일 수도 있다. 실제로 진핵 세포에서 유래된 유전자를 단백질을 당쇄화시키는 세포내 과정(process)이 결여된 박테리아에서 발현시켰을 때 당쇄화의 결여로 인해서 활성이 떨어진 단백질을 생산하게 된다.

<40> 당쇄화는 폴리펩타이드 뼈대(backbone)를 따라서 특정한 위치에서 일어나는데 일반적으로 두 가지 유형이 있다. O-형 당쇄화는 세린이나 쓰레오닌 잔기의 -OH기에 올리고당이 결합하는 것이고, 또 다른 하나는 N-형 당쇄화로 아스파라긴 잔기의 -NH기에 올리고당이 결합하는 형태이다. 특히 N-형 당쇄화는 특정 아미노산 배열을 가질 때 일어나며 그 서열은 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T)으로 알려져 있다(여기서 X는 프롤린을 제외하고 어떤 아미노산도 가능하다). N-연결된 올리고당과 O-연결된 올리고당의 구조는 서로 다르며 일반적으로 각 타입에서 발견되어지는 당 잔기들 또한 서로 다르다. 예를 들어서, O-연결된 당 잔기에서는, N-아세틸갈락토사민(N-acetylgalactosamine)이 항상 세린이나 쓰레오닌에 연결되어져 있는 반면에 모든 N-연결된 당 잔기에서는, 아스파라긴에 N-아세틸글루코사민(N-acetylglucosamine)이 연결되어져 있다. O-연결된 올리고당은 일반적으로 4개 이하의 당 잔기만을 포함하고 있지만 N-연결된 올리고당은 N-아세틸글루코사민과 만노스를 항상 포함하며 적어도 5개 이상의 당 잔기로 이루어져 있다.

<41> 본 발명은 단백질의 체내 안정성을 증가시키기 위해서

Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체에 관한 것이다. 본 발명에 이르러, 인간 인터페론 알파 단백질의 아미노산 서열에서 나선 형태 부위를 제외한 나머지 부위 어디에서도 아미노산 변이에 의해 당쇄화를 유도할 수 있는 것으로 밝혀졌다.

<42> 한 양태로서, 본 발명은 하기 아미노산 잔기 위치에서

Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체를 포함한다.

<43> -Cys1-Ser8(Cys1-Asp-Leu-Pro-Gln-Thr-His-Ser8);

<44> -Arg22-Thr52(Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Asn-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52);

<45> -Ser68;

<46> -Asp77;

<47> -Gln101-Asp114(Gln101-Gly-Val-Gly-Val-Thr-Glu-Thr-Pro-Leu-Met-Lys-Glu-Asp114);

<48> -Lys134-Ser137(Lys134-Tyr-Ser137); 및

<49> -Gln158-Glu165(Gln158-Glu-Ser-Leu-Arg-Ser-Lys-Glu165).

- <50> 보다 바람직한 양태로서, 본 발명은 하기 아미노산 잔기 위치에서
Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체를 포함한다.
- <51> -Arg22-Thr52(Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Asn-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52); 및
- <52> -Lys134-Ser137(Lys134-Tyr-Ser137).
- <53> 더욱 바람직한 양태로서, 본 발명은 26번째 류신 또는 94번째 라이신 중에서 하나 또는 둘 모두를 아스파라긴으로 변이시킨 인간 인터페론 알파 동종체를 포함한다.
- <54> 본 발명은 먼저 부가적인 당쇄화 자리를 갖도록 인간 인터페론 알파를 암호화하는 DNA 서열상에, N-형 당쇄화가 일어나도록 하나 이상의 뉴클레오타이드를 변이시킨 후, 그 DNA를 당쇄화를 수행하는 진핵 세포에 도입하여 발현시킴으로써 자연적으로 부가적인 당쇄화가 일어나도록 하는 것이다. 따라서, 본 발명에 따른 부가적인 당쇄화가 일어난 인간 인터페론 알파는 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T)서열이 증가하도록 DNA 서열을 변이시킴으로써 달성된다.
- <55> 한 양태로서, 본 발명은 하기 아미노산 잔기 위치에서
Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어

나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화하는 유전자를 포함한다.

<56> -Cys1-Ser8(Cys1-Asp-Leu-Pro-Gln-Thr-His-Ser8);

<57> -Arg22-Thr52(Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Asn-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52);

<58> -Ser68;

<59> -Asp77;

<60> -Gln101-Asp114(Gln101-Gly-Val-Gly-Val-Thr-Glu-Thr-Pro-Leu-Met-Lys-Glu-Asp114);

<61> -Lys134-Ser137(Lys134-Tyr-Ser137); 및

<62> -Gln158-Glu165(Gln158-Glu-Ser-Leu-Arg-Ser-Lys-Glu165).

<63> 보다 바람직한 양태로서, 본 발명은 하기 아미노산 잔기 위치에서

Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 증가하도록 하나 이상의 아미노산을 다른 아미노산으로 변이시킨 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화하는 유전자를 포함한다.

<64> -Arg22-Thr52(Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Asn-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52); 및

<65> -Lys134-Ser137(Lys134-Tyr-Ser137).

<66> 더욱 바람직한 양태로서, 본 발명은 26번째 류신 또는 94번째 라이신 중에서 하나 또는 둘 모두를 아스파라긴으로 변이시킨 인간 인터페론 알파 동종체를 포함한다.

<67> 본 발명의 양태에서, 인간 인터페론 알파를 암호화하는 유전자는 동물세포 발현용 인간 인터페론 알파 생산균주를 통해서 확보하였다. 통상 유전자의 클로닝과 분리는 당업계에 공지된 방법이 이용될 수 있다.

<68> 상기 과정을 통해서 확보된 인간 인터페론 알파 유전자는 하나 이상 선택된 코돈에서 변이될 수 있다. 본 발명의 명세서에서 변이란 인간 인터페론 알파를 암호화하는 유전자상의 하나 또는 그 이상의 코돈을 치환함으로써 인간 인터페론 알파의 아미노산 서열상에서 변화를 일어나게 하는 것이라고 정의할 수 있다. 보다 구체적으로는, 인간 인터페론 알파 아미노산 서열상에 부가적인 N-형 당쇄화가 일어날 수 있는 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 형성되도록 하나 이상의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환시키는 것을 말한다. 예를 들어서 본 발명의 실시예 3에서 26번째 류신을 아스파라긴으로 치환시키면 28번째 아미노산이 세린이므로 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 형성되어 부가적인 N-형 당쇄화가 일어날 것이다. 또한 134번째 라이신을 아스파라긴으로 치환시키면 136번째 아미노산이 세린이므로 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 형성되어 부가적인 N-형 당쇄화가 일어날 것이다.

<69> 본 발명의 양태로서, 인간 인터페론 알파에서 목적인 아미노산 변이를 암호화하는 코돈(codon)을 포함하는 합성 올리고뉴클레오타이드를 제작한다. 일반적으로 길이면에서 약 25개 뉴클레오타이드의 올리고뉴클레오타이드가 사용된다. 더 짧은 올리고뉴클레오타이드가 도입될 수도 있지만 최적의 올리고뉴클레오타이드는 변이를 암호화한 뉴클레오타이드의 양쪽으로 주형에 상보적인 12개 내지 15개의 뉴클레오타이드를 가지는 것이다. 이러한 올리고뉴클레오타이드가 주형 DNA에 충분히 혼성화될 수 있다. 본 발명에서 부가적인 당쇄화 자리의 생성을 위해서 사용한 합성 올리고뉴클레오타이드는 표 2.에 기재되어 있다. 이러한 올리고뉴클레오타이드는 당업계에 공지된 기술에 의해서 합성될 수 있다.

<70> 본 발명의 양태로서, 하나의 아미노산이 변이된 인간 인터페론 알파 동종체 DNA를 제공한다. 인간 인터페론 알파 DNA를 주형으로 하고, 변이를 암호화한 합성 올리고뉴클레오타이드를 프라이머(primer)로 사용하여 PCR을 수행한다. PCR의 가열(heating) 단계에서 이중 가닥 주형이 분리되면 각각의 단일 가닥 주형에 상보적인 프라이머가 혼성화(hybridization)된다. DNA 합성효소(DNA polymerase)는 변이를 암호화한 프라이머의 -OH기로부터 주형에 상보적인 뉴클레오타이드를 5' → 3' 방향으로 연결시켜 나간다. 결과적으로 두 번째 가닥은 변이를 암호화한 프라이머를 포함하게 되므로 유전자 상에서 목적인 변이를 암호화하게 되는 것이다. 상기 두 번째 가닥은 PCR의 반복되는 복제 단계에서 주형 DNA로 작용하게 되므로 변이를 암호화한 유전자는 계속 증폭될 것이다. 예를 들어서, 본 발명의 실시예 3에서는 26번째 아미노산인 류신을 아스파라긴으로 변이시키기 위해서 천연형의 인터페론 알파 DNA를 주형으로 하여 프라이머 IFN-A5'와

L26N2 그리고 L26N1과 IFN-A3'를 각각 쌍으로 하여 PCR을 수행했다. 결과적으로 26번째 아미노산 위치에 류신 대신 아스파라긴에 해당하는 코돈으로 변이된 두 개의 DNA 단편을 얻을 수 있었다. 이렇게 하여 얻은 두 가지의 DNA 단편을 넣어주고 IFN-A5' , IFN-A3' 를 프라이머 쌍으로 하여 두 번째 PCR을 수행하면 26번째 아미노산 위치에 류신 대신 아스파라긴으로 변이되어 당쇄화가 일어날 수 있는 IFN-alpha-L26N의 변이유전자를 얻을 수 있었다.

<71> 본 발명의 추가 양태로서, 둘 이상의 아미노산 변이를 포함하는 인간 인터페론 알파 동종체가 제공된다. 둘 이상의 아미노산이 변이된 돌연변이는 여러 가지 방법에 의해서 제작될 수 있다. 변이시키고자 하는 둘 이상의 아미노산이 폴리펩타이드 상에서 가까이 위치한다면 그들은 목적인 아미노산 변이 모두를 암호화한 하나의 올리고뉴클레오타이드를 이용해서 동시에 변이될 수 있다. 따라서 상기된 제작 방법은 둘 이상의 아미노산 변이를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 프라이머로 이용한다는 것을 제외하고는 하나의 뉴클레오타이드를 변이시키는 인간 인터페론 알파 유전자 제작 방법과 동일하다. 그러나 변이시키고자 하는 둘 이상의 아미노산이 폴리펩타이드 상에서 멀리 위치한다면(10개 이상의 아미노산에 의해서 떨어져 있는 경우) 목적인 변이를 모두 암호화한 하나의 올리고뉴클레오타이드를 제작하는 것은 불가능하다.

<72> 대신에 다른 방법들이 도입되어야 한다. 첫 번째 방법은 각각의 아미노산이 변이를 포함하는 개별적인 올리고뉴클레오타이드를 제작하는 것이다. 그 올리고뉴클레오타이드들이 단일가닥 주형 DNA에 동시에 어닐링(annealing)되면 그 주형으로부터 합성된 두 번째 가닥 DNA는 목적인 아미노산 변이 모두를 암호화할

것이다. 본 발명에서 사용한 또 다른 방법은 그러한 동종체를 생산하기 위해서 두 차례 이상의 돌연변이 유발(mutagenesis)을 포함하고 있다. 1차 돌연변이 유발에서는 천연형의 DNA가 주형으로 사용되고, 첫 번째 목적인 아미노산 변이를 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 이 주형에 어닐링되면 이형 DNA(heteroduplex)가 제작된다. 2차 돌연변이 유발에서는 1차(상기) 돌연변이 유발에서 생성된, 변이된 DNA를 주형으로 이용한다. 그러므로 이 주형은 이미 적어도 하나 이상의 변이를 포함하고 있는 것이다. 부가적인 아미노산 변이를 포함하는 올리고뉴클레오타이드가 이 주형에 어닐링되면 결과적으로 생산되는 DNA는 1차와 2차 돌연변이 유발의 변이를 모두 암호화하게 되는 것이다. 이 결과물 DNA는 3차 돌연변이 유발에서 주형으로서 사용될 수 있다. 요약하면 상기 둘 이상의 뉴클레오타이드를 변이시키는 방법은 하나의 뉴클레오타이드를 변이시키는 방법을 여러 차례 반복하는 것이다. 예를 들어서, 본 발명의 실시예 3에서 천연형의 인터페론 알파 단백질의 26번 아미노산인 류신을 아스파라긴으로, 134번 아미노산인 라이신을 아스파라긴으로 동시에 변이시키기 위해서 134번 위치를 변이시킨 다음, 이를 주형으로 하여 26번 아미노산의 변이를 실시하였다. 결과적으로 두 부위가 동시에 변이된 인간 인터페론 알파 유전자를 얻을 수 있었다.

<73> 본 발명에 따른 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화하는 DNA 서열은 본 분야에 공지된 표준방법에 의해, 예를 들면 자동 DNA 합성기(예, 바이오서치, 어플라이드 바이오시스템™)를 사용하여 합성할 수도 있다.

<74> 본 발명에 따른 당쇄화된 동종체는 일반적으로 (a) 상기 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화한 DNA 서열을 이 DNA 서열에 작동 가능하게 연결되어

(operatively linked) 그의 발현을 조절하는 하나 또는 그 이상의 발현 조절 서열(expression control sequence)을 포함하는 벡터에 삽입시키고, (b) 이로부터 형성된 재조합 발현 벡터로 숙주를 형질전환 또는 형질감염시키며, (c) 생성된 형질전환 또는 형질감염체를 인간 인터페론 알파 동종체 DNA 서열이 발현되도록 적절한 배지 및 조건하에 배양하여 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체를 분리함으로써 제조한다.

<75> 연관된 관점으로서, 본 발명은 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 재조합 발현 벡터 및 이러한 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 숙주 세포를 제공한다.

<76> 물론 모든 벡터와 발현 조절 서열이 본 발명의 DNA 서열을 발현하는데 모두 동등하게 기능을 발휘하지는 않는다는 것을 이해하여야만 한다. 마찬가지로 모든 숙주가 동일한 발현 시스템에 대해 동일하게 기능을 발휘하지는 않는다. 그러나, 당업자라면 과도한 실험적 부담 없이 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 채로 여러 벡터, 발현 조절 서열 및 숙주 중에서 적절한 선택을 할 수 있다. 예를 들어, 벡터를 선택함에 있어서는 숙주를 고려하여야 하는데, 이는 벡터가 그 안에서 복제되어야만 하기 때문이다. 벡터의 복제 수, 복제 수를 조절할 수 있는 능력 및 당해 벡터에 의해 암호화된 다른 단백질, 예를 들어 항생제 마커의 발현도 또한 고려되어야만 한다. 발현 조절 서열을 선정함에 있어서도, 여러 가지 인자들을 고려하여야만 한다. 예를 들어, 서열의 상대적 강도, 조절가능성 및 본 발명의 DNA 서열과의 상용성 등, 특히 가능성 있는 이차 구조와 관련하여 고려하여야 한다. 또한 숙주를 선정함에 있어서도, 선택된 벡터와의 상용성, 뉴클

레오타이드 서열에 의해서 암호화된 산물의 독성, 이들의 분비 특성, 폴리펩타이드를 올바르게 폴딩(folding)할 수 있는 능력, 발효 또는 배양 필요조건, 그리고 뉴클레오타이드 서열에 의해서 암호화된 산물의 정제 용이성 등을 고려하여야 한다.

<77> 본원 명세서에 사용된 '벡터'란 용어는 외래 유전자를 숙주 세포 내로 안정적으로 운반할 수 있는 운반체로서의 DNA 분자를 말한다. 유용한 벡터가 되기 위해서는 복제될 수 있어야 하며, 숙주 세포 내로 유입할 수 있는 방안을 갖추어야 하고, 자신의 존재를 검출 할 수 있는 수단을 구비하여야 한다. 또한 '재조합 발현 벡터'라는 용어는 일반적으로 외래 유전자가 숙주 세포에서 발현될 수 있도록 벡터에 작동적으로 연결되어 형성된 환상의 DNA 분자를 말한다. 재조합 발현 벡터는 수 개의 카피 및 그의 삽입된 이중의 DNA가 생성될 수 있다. 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주 세포에서 형질감염 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가, 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동적으로 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자를 세균 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함되게 된다. 발현 숙주가 진핵 세포인 경우에는 발현 벡터는 진핵 발현 숙주 세포 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.

<78> 본 발명에 따른 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화하는 DNA 서열을 발현시키기 위해 다양한 발현 벡터가 이용될 수 있다. 바람직하게는 인간 인터페론 알파 동종체에 당쇄화가 일어나야 하므로 진핵 숙주 세포에 적합한 발현 벡터가

사용되어야 한다. 진핵 숙주 세포에 유용한 발현 벡터들은 예를 들어 SV40, 소 유두종바이러스, 아데노바이러스 및 사이토메갈로바이러스로부터 유래된 발현 조절 서열을 포함하고 있다. 구체적인 벡터는 예를 들면, pCDNA3.1(+)\Hyg(Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA) 및 pCI-neo(Stratagen, La Jolla, Calif., USA)이다. 효모 세포에 유용한 발현 벡터는 2 μ 플라스미드와 그의 유도체, POT1 벡터(U.S. Pat. No. 4,931,373) 및 pPICZ A, B, 또는 C(Invitrogen) 등을 포함한다. 곤충 세포에 유용한 벡터는 pVL 941, pBluebac 4.5 및 pMelbac(Invitrogen)등을 포함한다.

<79> “조절 서열 (expression control sequence)”은 본 발명의 폴리펩타이드 발현에 필수적인 또는 이로운 핵산 서열들을 말한다. 각각의 조절 서열은 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산 서열에 천연적(native) 또는 외래적(foreign)일 수 있다. 그러한 조절서열에는 이에 제한되는 것은 아니지만, 리더 서열, 폴리아데닐화 서열, 프로펩타이드(propeptide) 서열, 프로모터, 인핸서(enhancer) 또는 업스트림(upstream) 활성화 서열, 시그날 펩타이드 서열 및 전사 종결인자 등을 포함한다. 최소한 조절 서열은 프로모터를 포함한다.

<80> 본 발명의 DNA 서열을 발현시키기 위하여, 매우 다양한 발현 조절 서열중 어느 것이라도 벡터에 사용될 수 있다. 포유동물 세포에서 발현을 지시하는데 적당한 조절 서열의 예는 SV40 및 아데노바이러스의 초기 및 후기 프로모터들, MT-1(멜라티오네인 유전자) 프로모터, 인간 사이토메갈로바이러스 초기 유전자(CMV), 라우스육종바이러스(RSV) 프로모터 및 인간의 유비퀴틴C(UbC) 프로모터

등을 포함한다. 부가적으로 포유동물 세포에서 발현을 향상시키기 위해서, 합성 인트론(intron)이 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 5'의 전사되지 않는 영역에 삽입될 수 있다. 곤충세포에서 발현을 지시하는데 적합한 조절 서열의 예는 폴리헤드린(polyhedrin) 프로모터, P10 프로모터, 바큐로바이러스(baculovirus) 39K 지연된-초기 유전자 프로모터 및 SV40 폴리아데닐화(polyadenylation) 서열 등을 포함한다. 효모에서 이용 가능한 조절 서열의 예는 효모의 α -교배 시스템의 프로모터, 효모 트리오스 포스페이트 이성질화효소(TPI) 프로모터 및 ADH2-4c 프로모터 등을 포함한다. 곰팡이 세포에서 발현을 지시하는데 적합한 조절 서열의 예에는 ADH3 프로모터 및 종결인자 등을 포함한다.

<81> 본 발명을 실시하는데 사용되는 또 다른 유용한 벡터의 구성성분이 시그널 펩타이드이다. 이러한 서열은 전형적으로 단백질을 암호화하는 유전자의 5'에 바로 위치하므로 단백질의 아미노 말단에 전사될 것이다. 시그널 펩타이드의 존재 또는 부재는 예를 들어서, 발현될 폴리펩타이드의 생산에 사용된 발현 숙주 세포에 따라서(발현될 폴리펩타이드가 세포내 또는 세포외 폴리펩타이드인지에 따라서) 그리고 분비물을 회수하기에 바람직한지에 따라서 달라질 것이다. 시그널 펩타이드는 폴리펩타이드가 발현되는 세포로부터 분비될 때 존재한다. 그러한 시그널 펩타이드가 존재한다면, 폴리펩타이드의 발현을 위해서 선택한 세포에 의해서 인지되는 것이어야만 한다. 시그널 펩타이드는 폴리펩타이드에 동형성(해당 폴리펩타이드와 일반적으로 연관되어진) 또는 이형성(해당 폴리펩타이드 이외에서 유래된)일 수도 있고 숙주세포에 동형성 또는 이형성일 수도 있다. 숙주

세포로부터 일반적으로 발현되어지는 시그널 펩타이드 또는 숙주 세포로부터 일반적으로 발현되지 않는 것일 수도 있다.

<82> 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 “작동 가능하게 연결된(operably linked)” 이라고 정의한다. 이것은 적절한 분자(예를 들면, 전사 활성화 단백질)가 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더(leader)가 성숙한 단백질의 분비에 참여함으로써 기능을 발휘했다면 그 단백질에 작동 가능하게 연결된 것이다. 프로모터가 암호화 서열의 전사를 조절했다면 그 서열에 작동 가능하게 연결된 것이다.; 리보솜 결합 자리가 암호화 서열의 해독이 가능한 위치에 놓여져 있다면 그 서열에 작동 가능하게 연결된 것이다. 일반적으로, “작동 가능하게 연결된”은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서(enhancer)는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 (oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.

<83> 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화한 유전자뿐만 아니라 상기의 구성 성분들(즉, 조절서열)을 포함하는 적합한 벡터의 제작은 기본적인 재조합 DNA기술을 사용해서 제작할 수 있다. 목적한 벡터를 형성하기 위해서 분리된 각각의 DNA 단편들이 결합되려면 먼저 제한 효소로 절단한 다음 특정한 순서(order)와 방향(orientation)을 고려하여 연결되어야 한다.

<84> DNA는 적절한 버퍼(buffer)내에서 특정한 제한 효소를 사용해서 절단될 수 있다. 일반적으로 약 0.2~1 g의 플라스미드 또는 DNA단편은 대략 20 μ l의 버퍼 용액에 해당 제한 효소 약 1~2 단위와 함께 사용된다. 적절한 버퍼, DNA농도, 배양 시간과 온도는 제한 효소의 제조업체에 의해서 특정된다. 일반적으로, 37 $^{\circ}$ C에서 약 한 두시간 정도 배양하는 것이 적당하지만 일부 효소들은 더 높은 온도를 필요로 한다. 배양 후에, 효소와 다른 불순물들은 페놀과 클로로포름의 혼합물로 상기 소화용액을 추출함에 의해서 제거되어지고 DNA는 에탄올로 침전시켜 수용액 층으로부터 회수할 수 있다. 이때 DNA단편들이 기능성 벡터를 형성할 수 있도록 연결되기 위해서는 DNA단편의 말단이 서로 상용성이 있어야만 한다.

<85> 절단된 DNA단편들은 전기영동(electrophoresis)을 이용해서 크기별로 분류되고 선택되어야 한다. DNA는 아가로스나 폴리아크릴아미드 매트릭스(matrix)를 통해서 전기영동될 수 있다. 매트릭스의 선택은 분리되어질 DNA 단편의 크기에 따라 결정된다. 전기 영동 후에 DNA는 전기용출(electroelution)에 의해서 매트릭스로부터 추출되거나, 매트릭스로부터 추출되거나, 저용융 아가로스가 사용되어졌다면 아가로스를 용융시키고 그로부터 DNA를 추출한다.

<86> 연결되어야 할 DNA 단편들은 동일한 모양으로 용액에 첨가되어야 한다. 그 용액은 ATP, 연결 효소(ligase)버퍼, DNA 0.5 g당 약 10 단위의 T4연결효소와 같은 연결효소를 포함하고 있다. DNA 단편이 벡터에 연결되려면, 먼저 벡터는 적합한 제한효소에 의해서 절단되어 선형화되어야 한다. 선형화된 벡터는 알칼리성 인산 가수분해 효소 또는 소 내장의 가수분해 효소로 처리되어야 한다. 이러한 인산 가수분해 효소 처리는 연결 단계 동안에 벡터의 자가 연결

(self-ligation)을 방지한다. 이와 같은 방법을 통해서 제작된 재조합 발현 벡터로 이제 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염시킨다.

<87> 숙주 세포를 선정함에 있어서, 보통 DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현효율이 높은 숙주가 통상 사용된다. 특히 본 발명에서는 인간 인터페론 알파 동종체에 당쇄화를 수행할 수 있는 진핵 숙주 세포를 사용해야만 한다. 적당한 효모 숙주 세포의 예는 사카로미세스(*Saccharomyces*) 및 한세놀라(*Hansenula*) 균주 등을 포함한다. 적절한 곰팡이 숙주 세포의 예는 트리코데르마(*Trichoderma*), 퓨사리움(*Fusarium*) 및 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 균주 등을 포함한다. 적합한 곤충 숙주 세포의 예는 Sf9 또는 Sf21과 같은 레피도프토라(*Lepidoptera*) 세포주 등을 포함한다. 적당한 포유동물 숙주 세포의 예는 CHO 세포주, COS 1, COS 7과 같은 COS 세포주, BHK 세포주 및 생쥐 세포와 같은 동물 세포, 조직 배양된 식물 세포 및 인간 세포 등을 포함한다.

<88> 폴리뉴클레오타이드는 Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology(1986) 및 Sambrook et al.,(ibid)과 같은 기본적인 실험 지침서에 기술된 방법에 의해서 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드를 숙주 세포로 도입하는데 바람직한 방법은 예를 들어서, 칼슘 포스페이트 형질전환(calcium phosphate transfection), DEAE-덱스트란 매개 형질전환(DEAE-dextran mediated transfection), 이환(transvection), 미세주입(microinjection), 양이온 지질-매개 형질전환(cationic lipid-mediated transfection), 전기천공(electroporation), 형질도입(transduction), 스크래프 로딩(scrape loading), 총알식 도입(ballistic introduction) 또는 감염(infection)등을 포함한다.

<89> 본 발명의 생산 방법에서, 숙주 세포들은 공지된 기술을 이용해서 폴리펩타이드의 생산에 적합한 영양 배지에서 배양된다. 예를 들어서, 세포들은 적당한 배지와 폴리펩타이드가 발현 및/또는 분리되는 것을 허용하는 조건 하에, 실시된 실험실 또는 산업용 발효기에서 소규모 또는 대규모 발효, 셰이크 플라스크 배양에 의해서 배양될 수 있다. 배양은 공지된 기술을 사용해서, 탄소, 질소 공급원 및 무기염을 포함하는 적절한 영양배지에서 일어난다. 배지는 당업자에게 잘 알려져 있으며 시판되고 있는 것을 사용하거나 직접 제조하여 사용할 수 있다. 폴리펩타이드가 영양배지로 직접 분비된다면 폴리펩타이드는 배지로부터 직접 분리될 수 있다. 폴리펩타이드가 분비되지 않는다면, 그것은 세포의 여액(lysate)으로부터 분리될 수 있다.

<90> 폴리펩타이드는 당업계에 공지된 방법에 의해서 분리될 수 있다. 예를 들어서, 이로서 제한되는 것은 아니지만, 원심분리, 여과, 추출, 분무 건조, 증발, 또는 침전을 포함하는 전통적인 방법에 의해서 영양 배지로부터 분리될 수 있다. 더 나아가 폴리펩타이드는 크로마토그래피(예를 들면, 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기별 배제), 전기영동, 분별용해도(예를 들면, 암모늄 설페이트 침전), SDS-PAGE 또는 추출을 포함하여 일반에 공지된 다양한 방법을 통해서 정제될 수 있다.

<91> 본 발명은 상기의 과정을 통해서 수득된 부가적인 당쇄화가 일어난 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체를 제공한다. 본원의 명세서에서 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체란, Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T)서열이 증가하도록 변이된 인간 인터페론 알파 유전자를 진핵숙주 세포에 도입하여 발현시킴으로써 자발적으로

당쇄화가 일어난 발현산물이라고 정의할 수 있다. 즉, 인간 인터페론 알파 동종체의 부가적인 당쇄화 자리인 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T)의 아스파라긴 -NH기에 당잔기들이 공유결합함에 의해서 형성된 이형(heterogenous) 분자를 말한다.

<92> 본 발명은 또한 부가적인 당쇄화가 일어난 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체와 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 치료적 투여용 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체의 치료적 제제는 임의적인 생리학적으로 허용되는 담체(carrier), 부형제(exipient), 안정제(stabilizer)와 목적한 정도의 순도를 가지는 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체를 혼합하여 동결건조된(lyophilized) 케이크(cake)와 수용액 형태로 제조된다. 비경구 투여 제제는 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체와 투여 가능한 형태(용액, 현탁액 또는 유탁액)로 약제학적으로 허용되는 담체를 혼합함에 의해서 제조될 수 있다.

<93> 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제, 또는 안정제는 도입된 투여용량과 농도에서 투여자에게 독성이 없어야 하고 그 제제의 다른 구성성분들과 상용성이 있어야 한다. 예를 들어서 당해 제제는 폴리펩타이드에 해로운 것으로 알려진 산화제 또는 기타 물질들을 포함해서는 안된다.

<94> 적합한 담체는 인산, 시트르산, 및 그 외 유기산과 같은 버퍼; 아스코르브산(ascorbic acid)을 포함한 항산화제; 저분자량 폴리펩타이드; 혈장 알부민, 젤라틴, 및 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone)과 같은 친수성 폴리머; 글라이신, 글루타민, 아르기닌, 또는 라이신과 같은 아미노산; 글루코오스, 만노스, 또는 덱스트린을 포함한 단당류, 이당류, 그 외 탄

수화물; EDTA같은 킬레이트 인자; 아연, 코발트, 또는 구리와 같은 금속 이온; 만니톨 또는 소르비톨과 같은 당알코올; 나트륨과 같은 염-형성 카운터이온(counterion); 및/또는 트윈(Tween), 플루로닉(Pluronic), 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비이온성 계면활성제를 포함한다.

<95> 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체가 치료를 위한 투여용으로 사용되려면 멸균되어야만 한다. 멸균은 멸균 여과 막(sterile filtration membrane)을 통한 여과를 통해서 쉽게 달성될 수 있다.

<96> 치료용 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체 조성물은 일반적으로 멸균 접근 포트(sterile access port)를 가지고 있는 용기 예를 들면, 피하주사 바늘에 의해서 관통될 수 있는 마개를 가지고 있는 정맥 주사액 백(bag) 또는 바이알(vial)에 보관되어야 한다. 인간 인터페론 알파는 수용액 또는 동결 건조된 제제로서, 1회분 또는 다수회분 용량 용기 예를 들면, 밀봉된 바이알이나 앰플(ampoule)에 저장될 것이다. 동결 건조된 제제의 경우에, 10-ml 바이알을 5ml의 멸균-여과된 1%(w/v) 인간 인터페론 알파 수용액으로 채우고 그 결과 혼합물을 동결 건조시킨다. 주입액은 주사용 정균수(bacteriostatic Water-for-Injection)를 이용해서 동결 건조된 인간 인터페론 알파를 재용해(reconstruction)시켜 제조할 수 있다.

<97> 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체는 비경구 투여를 포함한, 적절한 기술에 의해서 동물에게 직접적으로 투여되고, 국소적 또는 전신으로 투여될 수 있다. 특정적인 투여 경로는 예를 들어서, 인간 인터페론 알파를 이용해서 인지되었거나 예상되는 부작용을 포함한 환자의 병력에 따라서 결정될 것이다. 비경

구 투여의 예는 피하조직, 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 투여를 포함한다.

가장 바람직하게, 투여는 지속적인 주입 (예를 들면 삼투압 펌프와 같은 미니 펌프) 또는 주사 예를 들면, 정맥내 또는 피하조직내 경로를 통하는 것이다. 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체의 경우에 바람직한 투여 방식은

피하조직내이다.

<98> 본 발명의 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체는 환자에게 치료에 효과적인 양으로 투여될 것이다. “치료에 효과적인” 이란 주어진 상태와 투여 방식에서 목적인 치료 효과를 나타내는데 충분한 양이라고 정의할 수 있다. 치료에 사용될 인간 인터페론 알파 조성물은 치료되어질 특정한 상태, 개개 환자의 임상 조건(특히, 인간 인터페론 알파 단독 처리시의 부작용), 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체 조성물의 전달 장소, 투여 방법, 투여 스케줄, 당업자에게 숙지된 다른 요건들을 고려해서 바람직한 의료 업무(practice)와 일관되게 제조되고 복용되어야 한다. 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체의 치료에 효과적인 양이란 그러한 사항들의 고려에 의해서 결정된다. 본 발명의 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체의 일일투여 유효량은 일반적으로 약 2×10^6 단위 내지 500×10^6 단위이다.

<99> 본 발명은 하기 실시예로 보다 구체적으로 예시될 것이다. 그러나, 이들 실시예는 단지 본 발명의 구현예이며 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.

<100> <실시예 1>

<101> 인간 인터페론 알파 유전자의 확보

<102> 인간 인터페론 알파 유전자는 당사에서 보유하고 있는 인터페론 알파 생산 균주를 변이시켜 사용하였다. 보유하고 있는 인터페론 알파의 유전자는 대장균에서 발현을 위해 전서열이 없는 것으로 이 유전자에 화학적으로 합성한 올리고데옥시뉴클레오타이드를 사용하여 PCR로 인터페론 알파의 전서열을 제작하였다. 전서열이 없는 인간 인터페론 알파 유전자를 PiaE5-1과 IFN-A5' 합성 올리고데옥시뉴클레오타이드로 PCR 증폭시켰다. 증폭된 DNA 단편을 다시 최종적으로 인간 인터페론 알파 유전자의 5' 말단에 제한효소 절단부위를 도입하기 위해 PiaE5-2와 IFN-A3'의 합성 올리고데옥시뉴클레오타이드로 PCR 증폭시켰다. 이 때에 사용된 합성 올리고데옥시뉴클레오타이드는 표 1과 같다.

<103> 【표 1】

전서열을 제작하는데 프라이머로 사용된 합성 올리고데옥시뉴클레오타이드

| 프라이머 명칭 | 프라이머 서열 | 서열번호 |
|---------|--|------|
| PiaE5-1 | 5-'GTGCTCAGCTGCAAGTCAAGCTGCTCTGTGGGCTGTGATCTGCCTCAAACCCAC-3' | 1 |
| PiaE5-2 | 5'-ATGGCCTTGACCTTTGCTTTACTGGTGGCCCTCCTGGTGCTCAGCTGCAAGTCA-3' | 2 |
| IFN-A5' | 5'-TCCCAAGCTTATGGCCTTGACCTTTGCTTTACTG-3' | 3 |
| IFN-A3' | 5'-TGGGATCCTCATTCCTTACTTCTAAACTTTCTTG-3' | 4 |

<104> <실시예 2>

<105> 인간 인터페론 알파 유전자에서 변이부위의 선정

<106> 인간 인터페론 알파의 부가적인 당쇄화 자리의 선정을 위해

Walter(Structure(1996) vol.4, 1453)의 구조분석 결과를 활용하였다. 선정부위의 결정에서 1차로 인간 인터페론 알파 단백질의 아미노산 서열에 있어서 나선 형태의 부위는 제외하였다.(도 1) 1차로 나선 형태의 부위가 제외된 서열 중에서 3차원 구조에서 천연형의 인터페론에서 107위치의 쓰레오닌 잔기에 O-형 당쇄화가 존재함을 고려하여 2차 선정 부위를 결정하였다. 2차로 선정된 부위에서 N-형 당쇄화의 모티브로 변환이 용이한 부위를 최종 선정하였다.

<107> <실시예 3>

<108> 인간 인터페론 알파 동종체의 제작

<109> 부가적인 당쇄화 자리를 갖도록 하나 이상의 아미노산이 변이된 인간 인터페론 알파를 암호화하는 유전자는 합성 올리고데옥시뉴클레오타이드를 프라이머로 사용하여 PCR을 수행하면 변이될 수 있었다. 여기에 사용된 합성 올리고데옥시뉴클레오타이드는 표 2와 같다.

<110> 【표 2】

부가적인 당쇄의 생성을 위해서 프라이머로 사용된 합성 올리고데옥시뉴클레오타이드

| 프라이머 명칭 | 프라이머 서열 | 서열번호 |
|---------|---|------|
| L26N1 | 5'-GCACAGATGAGGCGCATCTCTAACTTCTCCTGCTTGAAGGACAGA-3' | 5 |
| L26N2 | 5'-TCTGTCCTTCAAGCAGGAGTTAAGAGAGATGCGCCTCATCTGTGC-3' | 6 |
| K134N1 | 5'-ACTCTCTATCTGAAAGAGAAGAAGTACAGCCCTTGTGCCTGGGAG-3' | 7 |
| K134N2 | 5'-CTCCCAGGCACAAGGGCTGTAGTTCTTCTTTTCAGATAGAGAGT-3' | 8 |
| IFN-A5' | 5'-TCCCAAGCTTATGGCCTTGACCTTTGCTTTACTG-3' | 9 |
| IFN-A3' | 5'-TGGGATCCTCATTCCTTACTTCTTAAACTTTCTTG-3' | 10 |

<111> (1) L26N 변이 인간 인터페론 알파 동종체의 제작 (도 3)

<112> 실시예 1에서 확보된 인간 인터페론 알파 유전자를 IFN-A5' 와 L26N2, L26N1과 IFN-A3' 합성 올리고데옥시뉴클레오타이드로 각각 PCR로 증폭시켜 DNA 단편을 제작하였다. 제작된 각각의 DNA 단편을 정제 후, 0.2M NaOH/2mM EDTA로 변성 (denaturation)시킨 다음, 다시 PCR을 실시하여 목적인 부위의 아미노산이 교체 (Leu→Asn)된 유전자를 제작하였다. 결과적으로 도 3에 나타낸 바와 같이 26번째 아미노산 위치에 류신 대신 아스파라긴에 해당하는 코돈으로 변이된 두 개의 DNA 단편을 얻을 수 있었다. 이렇게 하여 얻은 두 가지의 DNA 단편을 넣어주고 IFN-A5' , IFN-A3' 를 프라이머 쌍으로 하여 두 번째 PCR을 수행하면 26번째 아미노산이 아스파라긴으로 변이되어 부가적인 당쇄화가 일어날 수 있는 IFN-alpha-L26N의 변이유전자를 얻을 수 있었다.

<113> (2) K134N 변이 인간 인터페론 알파 동종체의 제작(도 4)

<114> L26N 변이 인간 인터페론 알파 동종체의 제작방법과 동일한 방법으로 인간 인터페론 알파 유전자를 IFN-A5' 와 L134N2, L134N1과 IFN-A3' 합성 올리고데옥시뉴클레오타이드로 각각 PCR로 증폭시켜 DNA 단편을 제작하였다. 결과적으로 도 4에 나타낸 바와 같이 134번째 아미노산 위치에 라이신 대신 아스파라긴에 해당하는 코돈으로 변이된 두 개의 DNA 단편을 얻을 수 있었다. 이렇게 하여 얻은 두 가지의 DNA 단편을 넣어주고 IFN-A5' , IFN-A3' 를 프라이머 쌍으로 하여 두 번째

PCR을 수행하면 134번째 아미노산이 아스파라긴으로 변이되어 부가적인 당쇄화가 일어날 수 있는 IFN- α -K134N의 변이유전자를 얻을 수 있었다.

<115> (3) L26N 및 K134N이 모두 변이된 인간 인터페론 알파 동종체의 제작(도 5)

<116> K134N 변이 인간 인터페론 알파 동종체를 이용하여 L26N변이 인간 인터페론 알파 동종체를 제작하는 방법과 동일하게 수행하였다. 다시 말해서 우선 도 4와 같은 방법으로 134번째 위치를 변이시킨 다음, 이를 주형으로 하여 도 3과 같은 방법으로 26번째 위치를 변이하였다. 결과적으로 두 부위가 동시에 변이된 인간 인터페론 알파 유전자를 얻을 수 있었다.

【발명의 효과】

<117> 본 발명에 따른 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체는 체내 안정성이 높아 임상에서 적용용량 및 투여 횟수를 줄일 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

하기 아미노산 잔기 위치에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체:

-Cys1-Ser8(Cys1-Asp-Leu-Pro-Gln-Thr-His-Ser8);

-Arg22-Thr52(Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Asn-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52);

-Ser68;

-Asp77;

-Gln101-Asp114(Gln101-Gly-Val-Gly-Val-Thr-Glu-Thr-Pro-Leu-Met-Lys-Glu-Asp114);

-Lys134-Ser137(Lys134-Tyr-Ser137); 및

-Gln158-Glu165(Gln158-Glu-Ser-Leu-Arg-Ser-Lys-Glu165).

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 하기 아미노산 잔기 위치에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체:

-Arg22-Thr52(Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Asn-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52); 및

-Lys134-Ser137(Lys134-Tyr-Ser137).

【청구항 3】

제 2항에 있어서, 26번째 류신 또는 94번째 라이신 중에서 하나 또는 둘 모두를 아스파라긴으로 변이시킨 인간 인터페론 알파 동종체.

【청구항 4】

하기 아미노산 잔기 위치에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화하는 유전자:

-Cys1-Ser8(Cys1-Asp-Leu-Pro-Gln-Thr-His-Ser8);

-Arg22-Thr52(Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Asn-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52);

-Ser68;

-Asp77;

-Gln101-Asp114(Gln101-Gly-Val-Gly-Val-Thr-Glu-Thr-Pro-Leu-Met-Lys-Glu-Asp114);

-Lys134-Ser137(Lys134-Tyr-Ser137); 및

-Gln158-Glu165(Gln158-Glu-Ser-Leu-Arg-Ser-Lys-Glu165).

【청구항 5】

제 4항에 있어서, 하기 아미노산 잔기 위치에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화하는 유전자:

-Arg22-Thr52(Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Asn-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52); 및
-Lys134-Ser137(Lys134-Tyr-Ser137).

【청구항 6】

제 5항에 있어서, 26번째 류신 또는 94번째 라이신 중에서 하나 또는 둘 모두를 아스파라긴으로 변이시킨 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화하는 유전자.

【청구항 7】

하기 아미노산 잔기 위치에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화하는 유전자를 포함하는 발현 벡터:

-Cys1-Ser8(Cys1-Asp-Leu-Pro-Gln-Thr-His-Ser8);
-Arg22-Thr52(Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Asn-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52);
-Ser68;
-Asp77;

-Gln101-Asp114(Gln101-Gly-Val-Gly-Val-Thr-Glu-Thr-Pro-Leu-Met-Lys-Glu-Asp114);

-Lys134-Ser137(Lys134-Tyr-Ser137); 및

-Gln158-Glu165(Gln158-Glu-Ser-Leu-Arg-Ser-Lys-Glu165).

【청구항 8】

제 7항에 있어서, 하기 아미노산 잔기 위치에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화한 유전자를 포함하고 있는 발현 벡터:

-Arg22-Thr52(Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Asn-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52); 및

-Lys134-Ser137(Lys134-Tyr-Ser137).

【청구항 9】

제 8항에 있어서, 26번째 류신 또는 94번째 라이신 중에서 하나 또는 둘 모두를 아스파라긴으로 변이시킨 동종체를 암호화한 유전자를 포함하고 있는 발현 벡터.

【청구항 10】

하기 아미노산 잔기 위치에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화하는 유전자를 포함하는 발현벡터로 형질전환 또는 형질감염된 진행 숙주 세포:

-Cys1-Ser8(Cys1-Asp-Leu-Pro-Gln-Thr-His-Ser8);

-Arg22-Thr52(Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Asn-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52);

-Ser68;

-Asp77;

-Gln101-Asp114(Gln101-Gly-Val-Gly-Val-Thr-Glu-Thr-Pro-Leu-Met-Lys-Glu-Asp114);

-Lys134-Ser137(Lys134-Tyr-Ser137); 및

-Gln158-Glu165(Gln158-Glu-Ser-Leu-Arg-Ser-Lys-Glu165).

【청구항 11】

제 10항에 있어서, 하기 아미노산 잔기 위치에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화한 유전자를 포함하는 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 진핵 숙주 세포:

-Arg22-Thr52(Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Asn-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52); 및

-Lys134-Ser137(Lys134-Tyr-Ser137).

【청구항 12】

제 11 항에 있어서, 26번째 류신 또는 94번째 라이신 중에서 하나 또는 둘 모두를 아스파라긴으로 변이시킨 동종체를 암호화한 유전자를 포함하는 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 진핵 숙주 세포.

【청구항 13】

하기 아미노산 잔기 위치에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화하는 유전자를 포함하는 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 진핵 숙주 세포를 배양하고 그 배양물로부터 당쇄화된 동종체를 분리하는 과정을 포함하여, 당쇄화된 인간 성장 호르몬 동종체를 제조하는 방법:

-Cys1-Ser8(Cys1-Asp-Leu-Pro-Gln-Thr-His-Ser8);

-Arg22-Thr52(Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Asn-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52);

-Ser68;

-Asp77;

-Gln101-Asp114(Gln101-Gly-Val-Gly-Val-Thr-Glu-Thr-Pro-Leu-Met-Lys-Glu-Asp114);

-Lys134-Ser137(Lys134-Tyr-Ser137); 및

-Gln158-Glu165(Gln158-Glu-Ser-Leu-Arg-Ser-Lys-Glu165).

【청구항 14】

제 13항에 있어서, 하기 아미노산 잔기 위치에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체를 암호화한 유전자를 포함하는 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 진핵 숙주 세포를 배양하고 그 배양물로부터 당쇄화된 동종체를 분리하는 과정을 포함하여, 당쇄화된 인간 성장 호르몬 동종체를 제조하는 방법:
 -Arg22-Thr52(Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Asn-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52); 및
 -Lys134-Ser137(Lys134-Tyr-Ser137).

【청구항 15】

제 14항에 있어서, 26번째 류신 또는 94번째 라이신 중에서 하나 또는 둘 모두를 아스파라긴으로 변이시킨 동종체를 암호화한 유전자를 포함하는 발현 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 진핵 숙주 세포를 배양하고 그 배양물로부터 당쇄화된 동종체를 분리하는 과정을 포함하여, 당쇄화된 인간 성장 호르몬 동종체를 제조하는 방법.

【청구항 16】

하기 아미노산 잔기 위치에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체에 부가적인 당쇄화가 일어난 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체:

-Cys1-Ser8(Cys1-Asp-Leu-Pro-Gln-Thr-His-Ser8);

-Arg22-Thr52(Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Asn-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52);

-Ser68;

-Asp77;

-Gln101-Asp114(Gln101-Gly-Val-Gly-Val-Thr-Glu-Thr-Pro-Leu-Met-Lys-Glu-Asp114);

-Lys134-Ser137(Lys134-Tyr-Ser137); 및

-Gln158-Glu165(Gln158-Glu-Ser-Leu-Arg-Ser-Lys-Glu165).

【청구항 17】

제 16항에 있어서, 하기 아미노산 잔기 위치에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체에 부가적인 당쇄화가 일어난 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체:

-Arg22-Thr52(Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Asn-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52); 및

-Lys134-Ser137(Lys134-Tyr-Ser137).

【청구항 18】

제 17항에 있어서, 26번째 류신 또는 94번째 라이신 중에서 하나 또는 둘 모두를 아스파라긴으로 변이시킨 동종체에 부가적인 당쇄화가 일어난 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체.

【청구항 19】

하기 아미노산 잔기 위치에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체에 부가적인 당쇄화가 일어난 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체와 약제학적으로 적합한 담체를 포함하는 약제학적 조성물:

-Cys1-Ser8(Cys1-Asp-Leu-Pro-Gln-Thr-His-Ser8);

-Arg22-Thr52(Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Asn-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52);

-Ser68;

-Asp77;

-Gln101-Asp114(Gln101-Gly-Val-Gly-Val-Thr-Glu-Thr-Pro-Leu-Met-Lys-Glu-Asp114);

-Lys134-Ser137(Lys134-Tyr-Ser137); 및

-Gln158-Glu165(Gln158-Glu-Ser-Leu-Arg-Ser-Lys-Glu165).

【청구항 20】

제 19항에 있어서, 하기 아미노산 잔기 위치에서 Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T) 서열이 하나 이상 형성되어 이 부위에서 당쇄화가 일어나도록 아미노산 변이된 인간 인터페론 알파 동종체에 부가적인 당쇄화가 일어난 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체와 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물:

-Arg22-Thr52(Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Asn-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52); 및
-Lys134-Ser137(Lys134-Tyr-Ser137).

【청구항 21】

제 20항에 있어서, 26번째 류신 또는 94번째 라이신 중에서 하나 또는 둘 모두를 아스파라긴으로 변이시킨 동종체에 부가적인 당쇄화가 일어난 당쇄화된 인간 인터페론 알파 동종체와 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

【청구항 22】

인간 인터페론 알파 단백질에 당쇄화 자리의 생성을 위해서 프라이머로 사용된 하기의 합성 올리고데옥시뉴클레오타이드:

5'-GCACAGATGAGGCGCATCTCTAACTTCTCCTGCTTGAAGGACAGA-3' (서열번호 5);

5'-TCTGTCCTTCAAGCAGGAGTTAAGAGAGATGCGCCTCATCTGTGC-3' (서열번호 6);

5'-ACTCTCTATCTGAAAGAGAAGAACTACAGCCCTTGTGCCTGGGAG-3' (서열번호 7);

1020020052365

출력 일자: 2003/9/1

5'-CTCCCAGGCACAAGGGCTGTAGTTCTTCTCTTTCAGATAGAGAGT-3' (서열번호 8) ;

5'-TCCCAAGCTTATGGCCTTGACCTTTGCTTTACTG-3' (서열번호 9); 또는

5'-TGGGATCCTCATTCTTACTTCTTAAACTTTCTTG-3' (서열번호 10).

【도면】

【도 1】

```

1  TCGACGCTT ATG GTC TTC ACC TTT GCT TTA CTC GAG GGC CTC CTC GTC CTC ACC TGT ACC TCA ACC TGT TCT GAG GGC TGT GAT CTC GCT
  AGGCTACGA TAC CGG AAC TCG AAA CGA AAT GAC CAG CGG GAG CAG CAG TCG ACC TTC AGT TCG ACC ACA CAG CCG ACA CTA GAC GGA
  M A L I I P A L L V A L L V L S C X S S C S V G C D L P

5  CAA ACC CAG ACC CTC GCA ACC ACC ACC ACC TAC ACC CTC CTC GCA CAG ACC ACC CTC ACC TCT CTC TTC TAC TAC ACC GCA CAG
  GCT TCG GAG TCG GAC CGA TCG TGT TGT ACC TAC GAG CAG CGC GCT TAC TGT CGG TAC ACA GAA ACC ACC ACC TTC CTC TCT GAA
  Q I H S L G S A A I L M L L A Q M A A I S L P S C L X D A H

35  GAG TTT GAA TTT CGC CAG GAG GAG TTT GGT ACC CAG TTC CAA ACC GCT GAA ACC ACC CTC GCT CTC CAG CAG ACC ACC CAG CAG ACC TTC
  CCG AAA CCG AAA GGT GCT CTC CTC AAA CGG TAC CAG ACC GCT TTC CGA CTT TCG TAC CGA CAG CAG GTA CTC TAC TAC GCT TAC ACC
  D P G P P Q X X P G X Q P Q X A X I I P V L H X M I Q Q I P

65  AAT CTC TTC ACC ACA ACC CAG TCA TCT GCT GCT TCG GAT GAG ACC CTC CTA GAG AAA TTC TAC ACT GAA CTC TAC CAG CAG CTC ACC GAG
  TTA GAG ACC TCG TCT TTC CTC ACC ACA CGA CGA ACC CTA CTC TCG GAG GAT CTC TTT ACC ACC TCA CTT GAG ACC CTC GCT TTA CCG
  X L P S I X D S S A A W D X I L D X P Y I X L Y Q Q L X D

95  CAG GAA GGT TCG GAG ATA CAG GGT GCT GCT GAG ACC CTC ACC ACC GAG GAG TGT ATT CTC GCT GCT GAG ACC AAA TAC TTC CAA
  GAC CTT CGG ACA CAG TAC GCT CCG CAG CTC TCG CTC TGA GGT GAG TAC TTC CTC CAG ACC TAA GAG CGA CAG TGT TTT ACC ACC GCT
  L B A C V I Q G V G V T X I P L M X X D S I L A V A X Y P Q

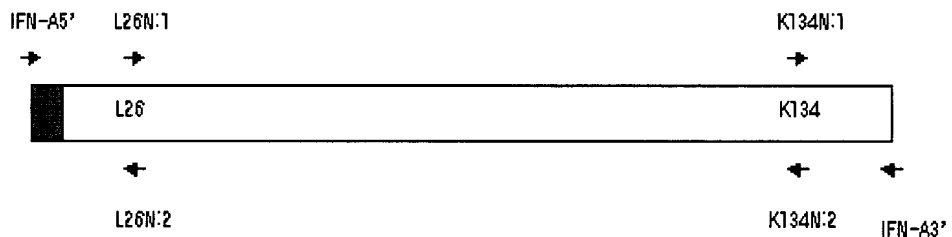
125  AAC ACC CTC TAC CTC AAA CAG ACC AAA TAC ACC CTC TCG GGT TCG GAG GCT GCT ACC CGA GAA ACC ACC ACC TCT TTT TCT TTC TCA
  TCT TAC TCA GAG ATA GAG TTT CTC TTC TTT ACC TCG ACA CCG ACC CTC CAA CAG TCT CCG CTT TAC TAC TCT ACC AAA ACC ACC ACC
  A I I L Y L X X X Y S P C A W X V V A A X I M A S P S L S

155  ACA ACC TTC CAA GAA ACC TTA ACA ACC ACC GAA TCA GATCGCA
  TCG TAC ACC GCT CTT ACC ACC TCT TCA ACC TCT ACC CTAAGCTT
  I H L Q X S L A S X X

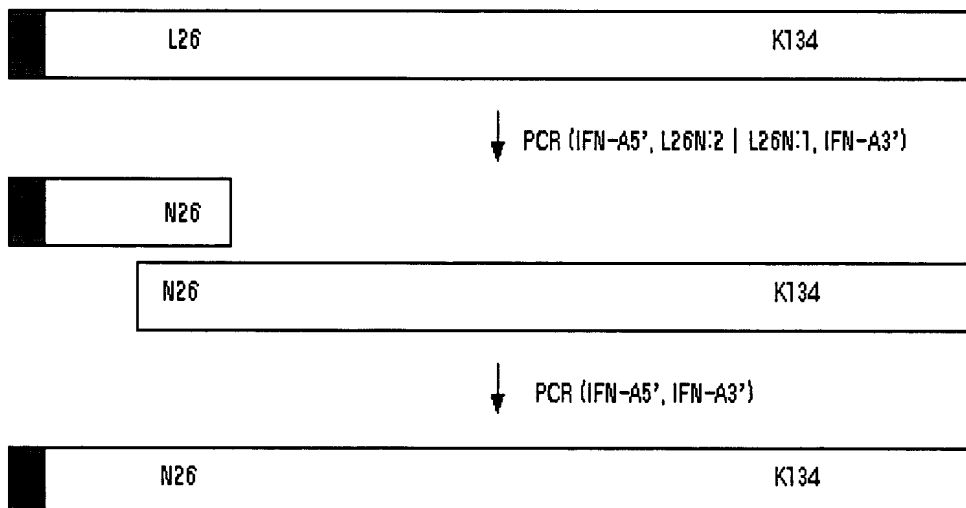
```

【도 2】

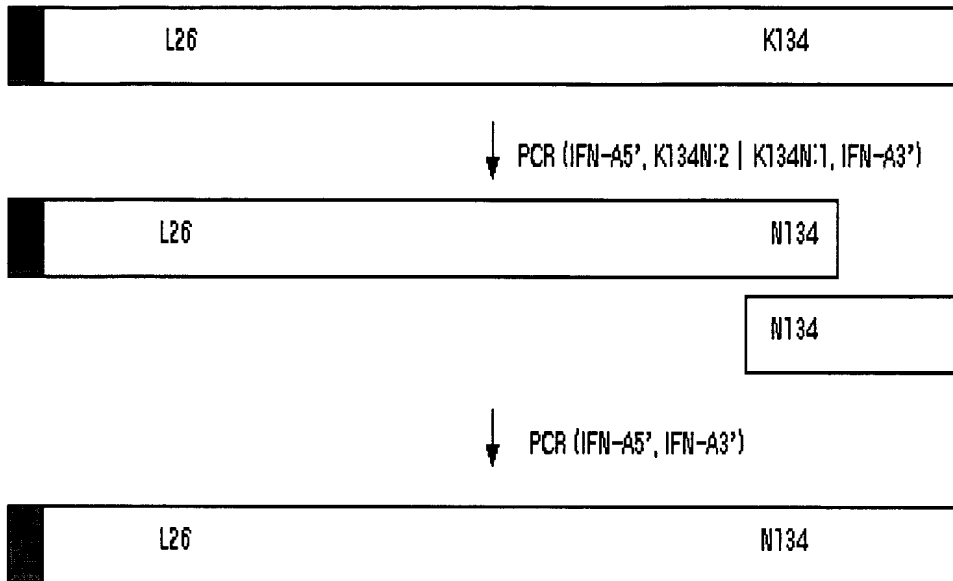
MALTFALLVALLVLSCKSSCSYG



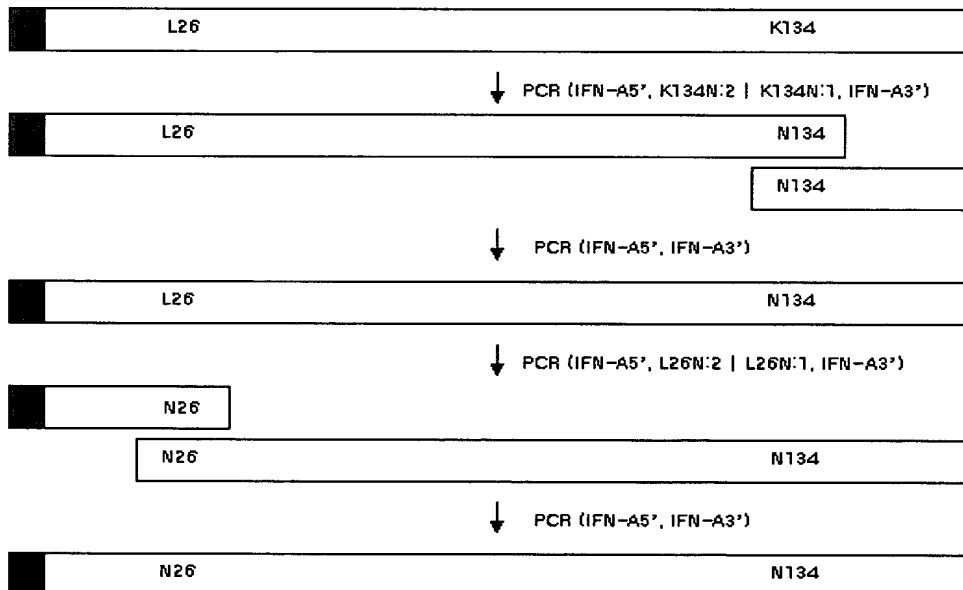
【도 3】



【도 4】



【도 5】



【서열목록】

| | | | | | | | | |
|---------------------|--|-------|--|-------|-----|-------|-----------------|--|
| <110> | CHEIL JEDANG CORPORATION | <120> | Glycosylated Human Interferon Alpha Isoforms | <160> | 10 | <170> | KopatentIn 1.71 | |
| <210> | 1 | <211> | 54 | <212> | DNA | <213> | | |
| Artificial Sequence | <220> | <223> | primer | <400> | 1 | | | |
| | gtgctcagct gcaagtcaag ctgctctgtg ggctgtgac tgcctcaaac ccac | | | | 54 | | | |
| <210> | 2 | <211> | 54 | <212> | DNA | <213> | | |
| Artificial Sequence | <220> | <223> | primer | <400> | 2 | | | |
| | atggccttga cctttgcttt actggtggcc ctctggtgc tcagctgcaa gtca | | | | 54 | | | |
| <210> | 3 | <211> | 34 | <212> | DNA | <213> | | |
| Artificial Sequence | <220> | <223> | primer | <400> | 3 | | | |
| | tccaagctt atggccttga cctttgcttt actg | | | | 34 | | | |
| <210> | 4 | <211> | 35 | <212> | DNA | <213> | | |
| Artificial Sequence | <220> | <223> | primer | <400> | 4 | | | |
| | tgggacctc attccttact tcttaaactt tcttg | | | | 35 | | | |
| <210> | 5 | <211> | 45 | <212> | DNA | <213> | | |
| Artificial Sequence | <220> | <223> | primer | <400> | 5 | | | |
| | gcacagatga ggcgcacctc taacttctcc tgcttgaagg acaga | | | | 45 | | | |
| <210> | 6 | <211> | 45 | <212> | DNA | <213> | | |
| Artificial Sequence | <220> | <223> | primer | <400> | 6 | | | |
| | tctgtccttc aagcaggagt taagagagat gcgcctcatc tgtgc | | | | 45 | | | |

<210> 7 <211> 45 <212> DNA <213>
Artificial Sequence <220> <223> primer <400> 7
actctctatc tgaaagagaa gaactacagc cttgtgcct gggag 45
<210> 8 <211> 45 <212> DNA <213>
Artificial Sequence <220> <223> primer <400> 8
ctcccaggca caagggtgt agttcttctc ttccagatag agagt 45
<210> 9 <211> 34 <212> DNA <213>
Artificial Sequence <220> <223> primer <400> 9
tcccaagctt atggccttga ctttgcttt actg 34
<210> 10 <211> 35 <212> DNA <213>
Artificial Sequence <220> <223> primer <400> 10
tgggatcctc attccttact tcttaaactt tcttg 35